

Хурцилава О.Г.¹, Иволгин Д.А.^{1,3}, Коровина К.В.³, Хрупина А.С.^{1,3},
Смолянинов А.Б.^{1,3}, Тюмина О.В.¹, Жаров Е.В.³, Селиванов Е.А.²

Современные методы выделения и подготовки образцов пуповинной крови к трансплантации в общественном регистре доноров

¹ СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург

² ФГУ РосНИИГТ ФМБА РФ, Санкт-Петербург

³ Покровский Банк Стволовых Клеток, Санкт-Петербург

Пуповинная кровь (ПК) была использована для лечения более 14 000 пациентов с различными заболеваниями – как злокачественными так и незлокачественными [1]. Эта особенность основана, прежде всего, на том, что ПК содержит гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) и гемопоэтические клетки-предшественники (ГКП) которые могут замещать систему крови должным образом подготовленного (кондиционированного) пациента [2]. Начало большому количеству исследований, подтверждающих, что ПК может быть потенциальным источником пригодных для трансплантации ГСК/ГКП положила успешная трансплантация ПК, осуществленная 6 октября 1988 года [3, 4].

Криоконсервация традиционно применяемых источников (ГСК/ГПК) – костного мозга и периферической крови для терапевтического использования проводится более 30 лет, тот же метод применяется и для длительного хранения ПК. Оптимальная криоконсервация и получение жизнеспособных ГСК/ГПК (определяемая по потенциалу приживления (энграфтмента)) зависит от ряда параметров, включающих:

- время перевозки и температуру хранения после сбора;
- обработку перед криохраниением;
- выбранный криопротектор;
- скорость, температуру и протоколы замораживания и размораживания;
- температуру длительного хранения [5].

Рассмотрим эти параметры более подробно, тем более что единой точки зрения на оптимум криоконсервации пока нет.

1. Время перевозки и температура хранения после сбора

По данным Hubel A et al. [6,7] на жизнеспособность клеток ПК, оцениваемый после размораживания, не оказывало влияние хранение и транспортировка ее в течение 24 часов после сбора.

В исследовании, посвященном оценке влияния места сбора, отсрочки обработки ПК, эффекту криоконсервации на прогениторные клетки ПК (Shlebak A et al., 1999), было выявлено что:

- значимых различий в общем количестве ядросодержащих клеток (ОЯК), мононуклеарных клеток (МНК), колониеобразующих единиц – гранулоцитарно-макрофагальных (КОЕ-ГМ) или колониеобразующей единицы – эритроцитов (КОЕ-Э) в образцах, взятых из вен пуповины или вен основания плаценты не было;

- хранение ПК при комнатной температуре или при +4°C более 9 часов приводит к значимому сокращению количества прогениторных клеток и их жизнеспособности;

- и криоконсервация, как после программируемого замораживания так и после пассивного замораживания, незначительно сокращала количества МНК, жизнеспособность и выживание КОЕ-ГМ, а потенциал КОЕ-ГМ продуцировать вторичные колонии значимо сокращался после криоконсервации (P = 0,04) [8].

2. Обработка перед криохраниением

На сегодняшний день достаточных данных о влиянии способа обработки пуповинной крови на количественные и качественные показатели ГСК/ГПК пуповинной крови нет, этот аспект оптимизации процедуры криоконсервации нуждается в дальнейшем изучении.

До недавнего времени ни у кого не вызывала сомнения предложенная P.Rubinstein et al. (1985) необходимость сокращения объема собранной ПК, то есть удаление плазмы и большей части эритроцитарной массы для оптимизации хранилища, уменьшения количества криопротектора [9]. Также, считается, что оставшиеся эритроциты, разрушающиеся в процессе криоконсервации, снижают жизнеспособность ГСК/ГПК

[10]. Однако, появившиеся недавно данные показали, что удаление из ПК только плазмы значительно увеличивает количество ядросодержащих клеток (ЯК) в образце ПК до и после размораживания без серьезного влияния на качественные показатели [11].

3. Выбор криопротектора

В 1959 г. в качестве криопротектора для ГСК/ГПК был предложен и получил широкое распространение в протоколах криоконсервации диметилсульфоксид (ДМСО) [12]. В настоящее время различия в протоколах использования ДМСО как криопротектора представляют собой использование его в разных концентрациях с целью максимально снизить количество токсических эффектов и осмотического стресса.

Имеющиеся в настоящее время протоколы криоконсервации используют методы, установленные для прогениторных клеток костного мозга (КМ) и периферической крови [13, 14], которые зачастую разрабатывались эмпирически. Такие протоколы могут привести к потере до 50% популяции ядерных клеток – потери для ПК неприемлемые. Исследуя влияние концентрации ДМСО, скорости его добавления и удаления, было подтверждено заключение об оптимальной для ПК концентрации ДМСО – 10% [13, 14].

Способность ДМСО вызывать токсические эффекты известна. Исследования на животных моделях показали дозозависимое сосудосуживающее действие ДМСО [15]. Также описаны и токсические явления при использовании ДМСО у людей. Такие явления развиваются во время реинфузии криоконсервированных клеток. Наиболее частые побочные эффекты, такие как тошнота, рвота и колики в животе наблюдаются практически у 50% пациентов [16] и, как считается, возникают из-за вагусного ответа, вызываемого внутривенной инфузией холодной жидкости.

Были также сообщения о сердечно-сосудистых и респираторных нарушениях, таких как гипотензия и брадикардия [17] или, гораздо реже, гипертензия и тахикардия, фатальная аритмия [18], остановка дыхания [19, 20] и диффузное альвеолярное кровотечение [21]. Некоторые центры описывали случаи токсического действия на нервную систему, такие как обратимая лейкоэнцефалопатия [22], эпилептические припадки [23, 24] и инсульт [25, 26]. Кроме того, сообщалось также и о подъеме уровней ЛДГ [27] и гемоглобинемии [28].

Наряду с традиционно применяемой в трансплантации стволовых клеток стандартной концентрацией ДМСО – 10%, было высказано предположение, что целесообразным может быть снижение его концентрации. Более низкие концентрации ДМСО, например, 5% [29, 30] или 3,5% [31], также являются эффективными криопротекторами. Отмывка стволовых клеток для удаления ДМСО, судя по всему, не оказывает неблагоприятного действия на гематологическое восстановление и может сократить токсические эффекты [32] и дробное применение стволовых клеток также может сократить риск побочных эффектов [33]. Несколько лет назад под эгидой ЕВМТ (Европейская Организация по Трансплантации Костного Мозга) проводилось исследование, в котором приняли участие 97 центров трансплантации и целью которого было оценить современную практику использования ДМСО и получить данные по его токсичности [34].

Большинство центров (n=78) использовали концентрацию 10% ДМСО и только 5 центров – 5% ДМСО. Из 95 центров токсические эффекты ДМСО наблюдались в 57 (60%), общее количество таких случаев составило 470. Всего, 95 центрами было проведено примерно 34 тысячи трансплантаций что дает минимальную итоговую частоту (т.е. общее количество побочных эффектов разделенное на общее количество трансплантаций) в 1,4%; примерно один на каждые 70 выполненных трансплантаций. Средняя частота токсических эффектов ДМСО на центр составила 2,1%. В то же время использование стратегий снижения количества ДМСО (концентрация менее 10% или отмывка клеток перед возвратом – 22 центра) была ассоциирована с итоговой частотой токсичности 0,3%.

Интересно, что при таких данных авторы сделали вывод о том, что неизвестно, приводит ли сокращение вводимого количества ДМСО к сокращению побочных эффектов и о том, что сегодня не существует никаких нормативных документов по его использованию и большинство трансплантационных центров разрабатывают собственные протоколы для использования и применения ДМСО.

4. Скорость, температура и протоколы замораживания и размораживания

Одним из первых получивших широкое распространение протоколов криоконсервации и размораживания пуповинной крови стал метод Нью-Йоркского Центра Крови [9], в котором образцы пуповинной крови после добавления 10% ДМСО пассивно охлаждались до -50°C и затем помещались в жидкую фракцию азота для хранения. Размораживание проводилось в водяной бане при $+37^{\circ}\text{C}$, затем клетки отмывались в растворе 2,5% альбумина и 5% декстрана, центрифугировались и ресуспендировались.

С развитием оборудования для замораживания и появлением т.н. замораживателей с программируемой скоростью, протоколы замораживания также претерпели изменения. Появилась возможность составлять программы замораживания – примером может служить протокол Университета Миннесоты [6]. В ряде исследований была показана эффективность программного замораживания. Так, например, в исследовании Meyer T.P. et al. [35] после криоконсервации на программном замораживателе, наблюдалась высокая жизнеспособность (89%), и количество CD34+ клеток (89%), а КОЕ (88%).

Одним из спорных моментов до сих пор является вопрос об отмывке клеток от ДМСО. Одно исследование показало, что размораживание и отмывка клеток приводит к значительной потере клеток (20% ОЯК по сравнению с количеством до замораживания), причем на отмывку приходится половина этой потери [36]. Удаление ДМСО не приводит к значимой потере количества клеток, жизнеспособности, активности КОЕ-ГМ или количестве CD34+ клеток, с учетом того, что данная процедура занимает 3–4 часа работы лаборатории [37]. Есть данные о том, что удаление ДМСО центрифугированием значительно снижает количество

и жизнеспособность CD34+ клеток после размораживания как ПК так и периферической крови [38]. С другой стороны, показатели кумулятивной частоты приживления и медианы времени восстановления количества нейтрофилов и тромбоцитов в группах с отмыванием клеток и без отмывания не различались [39].

T Hahn в своей работе предлагает вводить ПК пациентам сразу после размораживания не отмывая для упрощения процедуры и сокращения потерь клеток, особенно в случаях находящихся на пределе клеточных доз когда есть заключение, что предстоящая потеря клеток может неблагоприятно повлиять на исход ТПК [40].

Развитие технологий, и, в частности, появление автоматических клеточных сепараторов, частично разрешило многолетнюю дискуссию о необходимости отмывки клеток от ДМСО.

В одном из исследований при использовании для отмывки клеток автоматической системы были получены следующие результаты: медиана полученных CD34+ клеток составила 93% и ОЯК – 89%; кроме того, медиана жизнеспособности CD34+ клеток по оценке аннексином V и 7-аминоактиномицином D (7-AAD), была 98% и 94%, соответственно [41].

5. Температура длительного хранения

Около 10 лет назад стали появляться работы по оценке влияния на стволовые клетки длительного хранения в замороженном виде. Так, исследование длительного криохранения стволовых клеток КМ и периферической крови показало что ГСК остаются пригодными для трансплантации после 14 лет криохранения [42]. В конце прошлого века оценка количества КОЕ-ГМ, КОЕ-Э и колониеобразующих единиц гранулоцитов, моноцитов и мегакариоцитов (КОЕ-ГЭММ) в ПК после 12 лет хранения, а также построенная линейная модель (логарифм результатов жизнеспособности клеток) показала, что ПК может храниться длительное время без существенной потери ГПК [43].

При помощи исследований пролиферативной способности и способности к самовоспроизводству КОЕ-ГМ, КОЕ-Э и КОЕ-ГЭММ, а также оценки ex vivo экспансии и инфузии NOD/SCID мышам CD34+ клеток, выделенных из размороженных образцов ПК было продемонстрировано отсутствие отрицательного

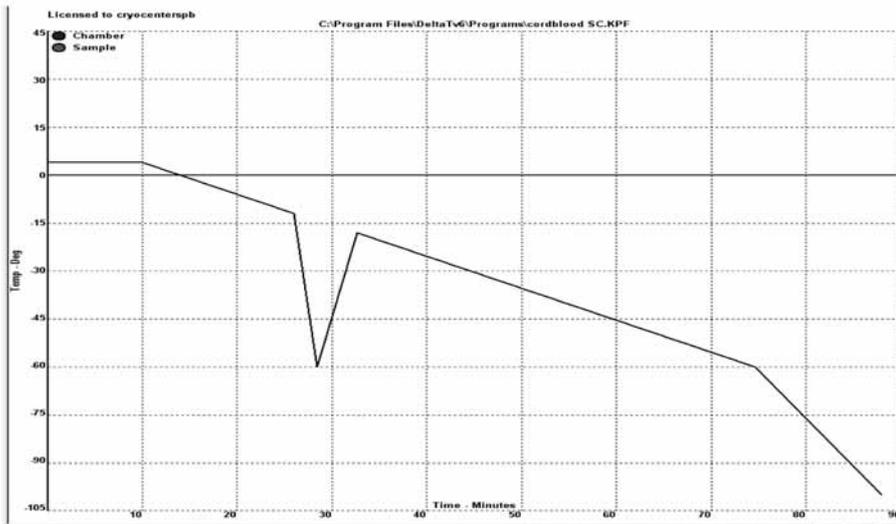


Рисунок 1. Кривая замораживания концентрата пуповинной крови для общественного регистра доноров.

эффекта длительного криохранения (в течение 15 лет) [44]. И по последним данным, в течение 23,5 лет [45] на количественные и качественные показатели ГСК/ГПК.

В нашей работе мы суммируем опыт Покровского банка стволовых клеток и НИЛ Клеточных Технологий СЗГМУ им. И.И. Мечникова по криоконсервации ГСК из ПК, размораживанию и отмывке клеток от ДМСО различными способами для того, чтобы разработать оптимальные для наших условий протоколы криоконсервации и подготовки ГСК ПК к трансплантации.

В исследование были включены 85 образцов концентрата лейкоцитарной фракции ПК помещенный на криохранение в Общественном регистре доноров ПК в период с октября 2009 г. по ноябрь 2010 (медиана срока криохранения – 7 мес., размах – 2–15 мес). Перед замораживанием выделение лейкоцитарной фракции проводилось на аппарате Serax S100 (Biosafe, Швейцария) (группа I; n=30), и методом двойного центрифугирования на рефрижераторной центрифуге Rotanta 460 RS (Hettich, Германия) (группа II; n=55). Криопакет (Pall, США) с концентратом и криопротектором (раствор ДМСО 10%) замораживался, упакованный в термоусадочный пакет (Thermogenesis, США). Замораживание концентрата осуществлялось в программируемом замораживателе Cryo 560-16 (Planer, Великобритания) по следующей схеме (рисунок 1), в модификации Покровского банка стволовых клеток (Патент № 416197. Приоритет изобретения от 11 декабря 2009 г.).

Стартовая температура – 4°C – удерживается в течение 10 минут.

Далее образец:

- охлаждается со скоростью 1°C/мин. до –12°C;
- образец охлаждается со скоростью 20°C/мин. до –60°C;
- образец нагревается со скоростью 15°C/мин. до –18°C;
- образец охлаждается со скоростью 1°C/мин. до –60°C;
- в конце образец охлаждается со скоростью 3°C/мин. до –100°C.

После размораживания все образцы обрабатывали (отмывали от криопротектора – р-р ДМСО 10% (Pall, Великобритания)) и проводили исследование качественных показателей.

Сейчас существуют уже и данные о клиническом применении ПК после длительного криохранения, в которых показано, что применение «старых», т.е. хранившихся 8 и более лет, образцов ПК не снижает итоговую выживаемость после трансплантации ПК по сравнению со «свежими» образцами ПК [46]. Длительность криохранения не коррелирует с худшими показателями итоговой выживаемости, бессобытийной выживаемости, трансплантат-ассоциированной смертности, рецидива или приживления [47].

В нашей работе мы суммируем опыт Покровского банка стволовых клеток – НИЛ Клеточных Технологий СЗГМУ им. И.И. Мечникова по выделению ГСК/ГПК из ПК, размораживанию и отмывке клеток от ДМСО различными способами для того, чтобы разработать оптимальные для наших условий протоко-

лы обработки, криоконсервации и подготовки ГСК/ГПК ПК к трансплантации.

Материалы и методы

В исследование были включены 85 образцов концентрата лейкоцитарной фракции ПК помещенный на криохранение в Общественном регистре доноров ПК Покровского банка стволовых клеток в период с октября 2009 г. по ноябрь 2010 г. (срок криохранения – 7,0 ± 0,42 мес.). Перед замораживанием выделение лейкоцитарной фракции проводилось на клеточном сепараторе Serax S100 (Biosafe, Швейцария) Kit-530 (группа I; n=30 образцов), и методом двойного центрифугирования на центрифуге Rotanta 460 RS (Hettich, Германия) (группа II; n=55 образцов). Затем все размороженные образцы обрабатывали (отмывали от криопротектора – 10% раствора ДМСО (Pall, Великобритания)) методом простого центрифугирования (технология Нью-Йоркского Центра Крови) [9] (подгруппа 1; n=21 образец), с помощью клеточного сепаратора Serax S100 (Biosafe, Швейцария) на Kit-600 (группа 2; n=14 образцов) и методом разведения (группа 3; n=50 образцов).

Во всех образцах определялось ОЯК, абсолютное количество CD34+/CD45+ клеток и жизнеспособность в концентрате лейкоцитарной фракции до замораживания, после размораживания и отмывки клеток от криопротектора. Также определялись показатели выхода (recovery) CD34+/CD45+ клеток, ЯК и жизнеспособности по формуле:

$$Y_{at}/Y_{pf} \times 100,$$

где Y_{at} – показатели после размораживания и отмывки, Y_{pf} – показатели до замораживания.

При отмывке ручным методом образцы ПК размораживались при 37°C на водяной бане в течение 5 минут. Непосредственно после размораживания на водяной бане ПК из криопакета шприцом переносилась в стерильный двойной пакет, заполненный раствором альбумина (2,5% раствор) на физиологическом растворе, затем пакет центрифугировался при 400g в течение 10 минут. Супернатант удалялся, а осажденные клетки ресуспендировались в растворе альбумина. Все процедуры проводились в воздушном потоке ламинарного бокса HeraSafe KS 12 («Heraeus», Германия).

Таблица 1.

Показатели концентрата ядросодержащих клеток (ЯСК) пуповинной крови при выделении различными способами до замораживания

Технология выделения/ метод размораживания	Общее количество ЯСК, $\times 10^6$ клеток	Выход ЯСК	Количество CD34+ клеток до замораживания, $\times 10^6$	Жизнеспособность клеток до замораживания (%)
I-группа:				
Клеточный сепаратор				
Serax S100 (Biosafe) Kit-530	1037,74 \pm 87,79	81,1 \pm 0,85	3,83 \pm 0,93	98,48 \pm 0,37
II-группа:				
Центрифуга				
Rotanta 460 RS (Hettich)	1119,65 \pm 55,70	78,7 \pm 1,13	3,54 \pm 0,30	95,56 \pm 0,92

Таблица 1.

Изменение показателей ядросодержащих клеток в концентрате пуповинной крови при выделении различными способами после размораживания

Технология выделения/ метод размораживания	Общее кол-во ЯСК после размораживания, $\times 10^6$ клеток	Выход ЯСК после размораживания	Кол-во CD34+ клеток после размора- живания, $\times 10^6$	Выход CD34+ клеток после размора- живания	Жизнеспособность клеток после размора- живания (%)	Выход жизне- способных клеток
I-группа:						
Клеточный сепаратор						
Serax S100 (Biosafe) Kit-530	998,31 \pm 81,49	97,38 \pm 2,11	3,49 \pm 0,87	89,85 \pm 1,28	88,13 \pm 1,16	89,48 \pm 1,09
II-группа:						
Центрифуга						
Rotanta 460 RS (Hettich)	941,32 \pm 48,77	84,55 \pm 1,53	2,99 \pm 0,25	85,71 \pm 1,67	78,90 \pm 1,87	83,07 \pm 2,18

Во втором случае размораживание образцов ПК проводилось аналогично на водяной бане при 37°C, но для отмывки клеток от криопротектора использовался набор для аппаратной отмывки CS-600 (Biosafe, Швейцария). Отмывочным буфером в данном случае также являлся 10% раствор альбумина на физиологическом растворе.

При методе разведения также использовался 10% раствор альбумина в соотношении 1:4.

После размораживания и отмывки от криопротектора концентрата лейкоцитарной взвеси проводился подсчет ОЯК при помощи гематологического анализатора «ACT diff 2» Beckman Coulter (Beckman Coulter, США), и количества и жизнеспособности CD34/45+ клеток на проточном цитометре Cytomix FC500 (Beckman Coulter, США). Определение количества клеток CD 34+/45+ осуществляли с помощью набора Stem-Kit (Beckman Coulter, США).

Пробоподготовку проводили стандартным образом согласно рекомендации производителя. Измерение проводили на проточном цитометре Cytomix FC500 (Beckman Coulter, США) с использованием программы СХР.

Результаты

В результате выделения ГСК/ГПК из ПК способом автоматической сепарации и двойного центрифугирования были получены следующие результаты: общее количество ядросодержащих клеток (ОЯК) $\times 10^6$ (выход ОЯК%) – 1037,74 \pm 87,79 (81,1 \pm 0,85%) и 1119,65 \pm 55,70 (78,7 \pm 1,13%), соответственно; количество и жизнеспособность CD34/45+ клеток в группах I и II составило 3,83 \pm 0,93 $\times 10^6$ и 3,54 \pm 0,30 $\times 10^6$, соответственно, и 98,48 \pm 0,37% и 95,56 \pm 0,92, соответственно ($p \leq 0,01$) (таблица 1). Выход CD34/45+ в группе I и II после размораживания составил 89,85 \pm 1,28% и 85,71 \pm 1,67%, соответственно, выход ядерных клеток в группах I и II составил 97,38 \pm 2,11% и 84,55 \pm 1,53%, соответственно, жизнеспособность клеток после размораживания в группах I и II составила 88,13 \pm 1,16% и 78,90 \pm 1,87% соответственно (таблица 2).

Полученные данные, в целом, соответствуют данным литературы [48, 49] и показывают, что по всем общепринятым показателям качества ПК метод автоматической сепарации эффективнее стандартной методики двойного центрифугирования. Кроме того, показатели размороженного концентрата, выделенно-

го автоматическим способом, в частности, выход ОЯК, CD34+, жизнеспособности, также соответствуют данным литературы [50] и достоверно превышают показатели концентрата, размороженного после выделения методом центрифугирования.

Также, при сравнении способов размораживания были получены следующие результаты: выход CD34/45+ в группах 1, 2 и 3 составил 83,17 \pm 4,16%, 92,75 \pm 1,77 и 84,58 \pm 1,5%, соответственно. Выход ЯК в группах 1, 2 и 3 составил 82,7 \pm 3,26%, 94,08 \pm 1,53 и 86,41 \pm 1,3%, соответственно, жизнеспособность клеток после размораживания в группах 1, 2 и 3 составила 82,01 \pm 3,66%, 87,58 \pm 1,77 и 80,72 \pm 1,61% соответственно (таблица 3). Эти данные свидетельствуют о том, что отмывка концентрата ГСК/ГПК с использованием автоматического сепаратора позволяет получить наиболее качественный образец клеточного концентрата для последующей трансплантации.

В свете полученных нами данных представляется интересным совмещение показателей образца ПК по методу выделения ГСК/ГПК и методам подготовки к трансплантации.

В результате анализа мы получили 6 подгрупп – группы разделенные на основе метода выделения I и II подразде-

Таблица 3.

Показатели количества ядродержащих клеток (ЯСК) концентрата пуповинной крови после размораживания и отмывки различными способами

Методы отмывки ЯСК пуповинной крови от ДМСО	Общее кол-во ЯСК после отмывки от ДМСО, $\times 10^6$ клеток	Выход ЯСК после отмывки от ДМСО	Кол-во CD34+ клеток после отмывки от ДМСО, $\times 10^6$	Выход CD34+ клеток после отмывки от ДМСО	Жизнеспособность клеток после отмывки от ДМСО (%)	Выход жизнеспособных клеток
Отмывка методом простого центрифугирования	804,88±102,81	82,7±3,26	2,92±0,58	83,17±4,16	82,01±3,66	84,26±3,65
Отмывка на клеточном сепараторе Serax S100 (Biosafe) Kit-600	1072,47±113,6	94,08±1,53	2,43±0,44	92,75±1,77	87,58±1,77	88,65±1,71
Отмывка на центрифуге Rotanta 460 RS (Hettich)	966,71±48,13	86,41±1,3	3,37±0,53	84,58±1,5	80,72±1,61	84,94±1,97

Таблица 4.

Общие показатели ядродержащих клеток (ЯСК) в концентрате пуповинной крови после размораживания при отмывке различными способами

Технология выделения/метод размораживания	Общее кол-во ЯСК после размораживания, $\times 10^6$ клеток	Выход ЯСК после размораживания	Кол-во CD34+ клеток после размораживания, $\times 10^6$	Выход CD34+ клеток после размораживания	Жизнеспособность клеток после размораживания (%)	Выход жизнеспособных клеток
Группа I-1	779,32±160,5	82,79±5,03	2,57±0,87	82,19±7,15	88,6±1,6	90,38±1,35
Группа I-2	1103,7±155,34	96,9±1,11	1,9±0,39	92,7±2,7	87,7±2,23	89,19±2,13
Группа I-3	966,14±111,01	92,56±3,61	5,61±2,36	87,46±2	87,45±2,42	88,74±2,36
Группа II-1	832,99±132,94	82,61±4,32	3,3±0,77	84,24±4,26	74,75±6,93	77,52±7,1
Группа II-2	1016,26±171,37	89±2,61	3,38±0,93	92,86±1,37	87,24±3,22	87,66±3,11
Группа II-3	966,85±54,1	84,88±1,27	2,81±0,27	83,86±1,8	78,92±1,83	83,99±2,38

лялись в зависимости от способа размораживания и отмывки (I-1, I-2, I-3 и II-1, II-2 и II-3). Для этих подгрупп были получены следующие результаты представленные в *таблице 4*.

Из полученных данных видно, что наилучшие качественные показатели образца ПК наблюдаются при использовании автоматического клеточного сепаратора Serax S100, как для выделения, так и для отмывания концентрата ЯК после размораживания.

Также, нами проводилось исследование воздействия эритроцитов оставшихся в концентрате ЯК после выделения на жизнеспособность CD34/45+ клеток. Для этого проводился корреляционный анализ влияния гематокрита в образцах до криоконсервации на показатели размороженного клеточного концентрата. Гематокрит в образцах ПК составил 38,16±1,5%. В соответствии с нашими данными (*рисунок 2*) величина гематокрита не оказывает выраженного действия на выход и жизнеспособность CD34/45+ клеток (коэффициент корреляции -0,101 и -0,143, соответственно), что скорее подтверждает данные R.Chow [47].

Обсуждение

Успешное приживление при трансплантации ПК в значительной степени зависит от сбора адекватного количества гемопоэтических прогениторных клеток с последующей успешной криоконсервацией этих клеток без серьезных потерь в жизнеспособности и количестве. Исходя из этого, критерии криоконсервации, разработанные для стволовых клеток периферической крови и КМ, неприменимы для ПК. В первую очередь, это связано с большой разницей в количестве клеток между трансплантатом КМ при котором потеря до 50% стволовых клеток не является критичной и ПК, где потеря даже 10% может оказаться фатальной.

Сегодня все больше говорится о том, что одним из способов улучшения исходов трансплантации ПК является улучшение качества образцов ПК, помещаемых для длительного криохранения в общественные банки ПК. То есть каждый этап банкирования ПК, особенно такие критичные как выделение ЯК, криохранение и подготовка к трансплантации требуют особенного внимания.

Основываясь на полученных нами данных, можно сделать вывод что, при наличии соответствующего технического оснащения, наиболее эффективным методом обработки ПК как для выделения концентрата ЯК, так и для последующей его отмывки после размораживания является автоматический, и, в частности, система клеточной сепарации Serax S100 (Biosafe, Швейцария).

Так как данная система, к сожалению, не является широко распространенной, в основном, по экономическим причинам, то при использовании метода двойного центрифугирования каждый банк ПК и центр трансплантации должен делать выбор между подготовкой образца ПК для трансплантации путем разведения, что позволяет сохранить большее количество клеток а, значит, и приживление трансплантата будет более успешным, но с возможным развитием побочных токсических эффектов ДМСО, и менее высокой вероятностью приживления без побочных эффектов ДМСО в случае отмывки концентрата от криопротектора методом центрифугирования.

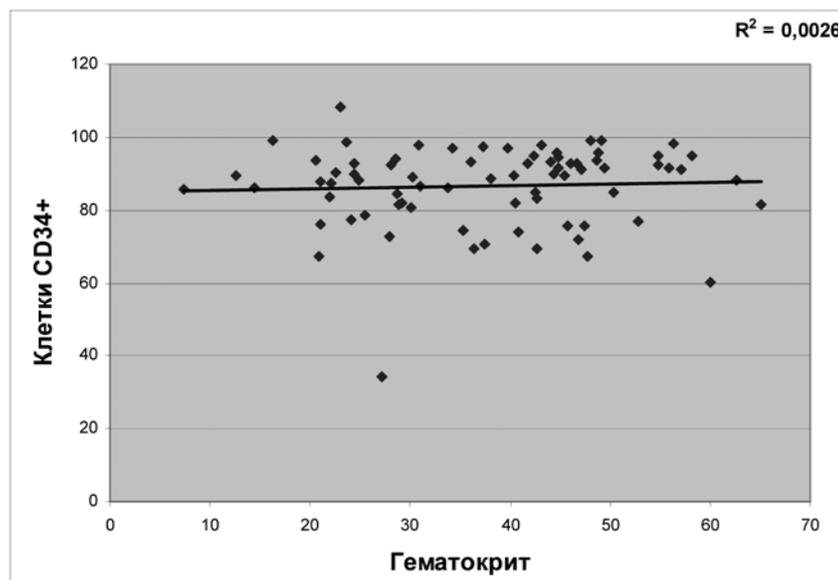
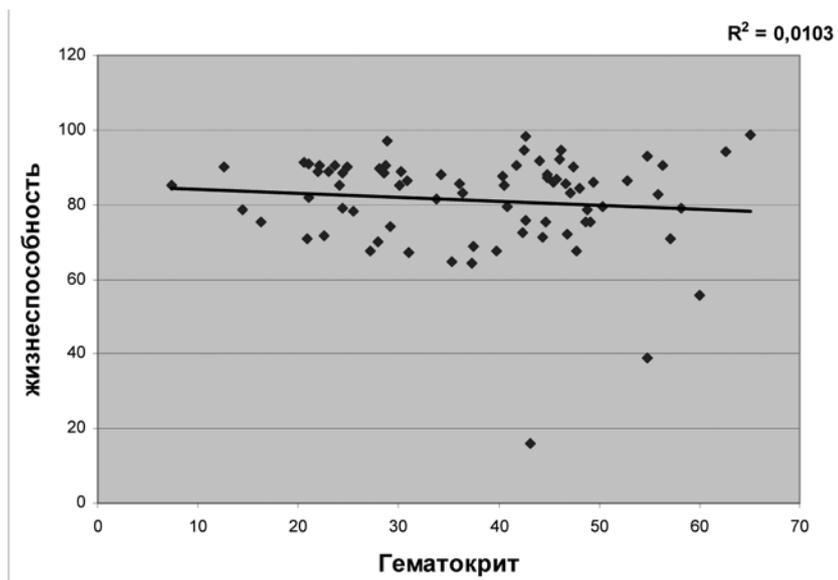


Рисунок 2. Зависимость выхода и жизнеспособности CD34/45+ клеток в пуповинной крови после размораживания от величины гематокрита до криоконсервации.

Литература

1. Broxmeyer H.E. Cord Blood Transplantation: A Mini Review Celebrating the 20th Anniversary of the First Cord Blood Transplant // The Hematologist.-2009.-№ 6(1).-P.7.
 2. Broxmeyer H.E., Smith FO. Cord Blood Hematopoietic Cell Transplantation // Appelbaum F.R., Forman S.J., Negrin R.S., Blume K.G.. Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation- 4th edn. - Wiley-Blackwell, West Sussex, United Kingdom, - 2009.- Section 4,- Ch. 3,- P. 559-576.
 3. Gluckman E., Broxmeyer H.E., Auerbach A.D., et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling // N Engl J Med.-1989.- № 321(17).- P.1174-1178.
 4. Broxmeyer H.E., Douglas G.W., Hangoc

G, Cooper S, Bard J, English D et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells // Proc Natl Acad Sci USA.- 1989.- № 86(10).- P. 3828-3832.
 5. Suzanne M.W., Austin E., Armitage S., Cryopreservation of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells for Therapeutic Use // Day J.G., Stacey G.N.. Cryopreservation and freeze-drying protocols - 2nd edn.- Humana Press Inc. Totowa, New Jersey,- 2007.- Ch. 17,- P. 237-259
 6. Hubel A. et al., Cryopreservation of cord blood after liquid storage // Cytotherapy.- 2003,-№ 5(5).- P.370-376.
 7. Hubel A. et al., Liquid storage, shipment, and cryopreservation of cord blood // Transfusion.- 2004.- № 44(4).- P. 518-525.
 8. Shlebak A.A. et al., Optimal timing for processing and cryopreservation of umbili-

cal cord haematopoietic stem cells for clinical transplantation // Bone Marrow Transplantation.- 1999.- № 23(2).- P.131-136
 9. Rubinstein P. et al. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 1995.- № 92(22).- P. 10119-10122.
 10. Querol S et al. Quality rather than quantity: the cord blood bank dilemma // Bone Marrow Transplantation.- 2010.- № 45(6).- P. 970-978.
 11. Chow R. et al. Cell recovery comparison between plasma-depletion/reduction- and red cell reduction processing of umbilical cord blood // Cytotherapy.- 2011.- № 13(9).- P. 1105-1119
 12. Lovelock, J.E., Bishop M.W.H.. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide // Nature.- 1959.- № 183(4672).- P.1394-1395.
 13. Hunt C.J., Armitage S.E., Pegg D.E.. Cryopreservation of umbilical cord blood: 2. Tolerance of CD34(+) cells to multimolar dimethyl sulphoxide and the effect of cooling rate on recovery after freezing and thawing // Cryobiology.- 2003.- № 46(1).-P.76-87.
 14. Hunt C.J., Armitage S.E., Pegg D.E.. Cryopreservation of umbilical cord blood: 2. Tolerance of CD34(+) cells to multimolar dimethyl sulphoxide and the effect of cooling rate on recovery after freezing and thawing // Cryobiology.- 2003.- № 46(1).-P. 61-75.
 15. Chaloupka J.C., Vinuela F., Vinters H.V. et al. 1.Technical feasibility and histopathologic studies of ethylene vinyl copolymer (EVAL) using a swine endovascular embolization model // Am J Neuroradiol.- 1994.- № 15(6).- P.1107-1115.
 16. Zambelli A., Poggi G., Da Prada G. et al.. Clinical toxicity of cryopreserved circulating progenitor cells infusion // Anticancer Res.- 1998.- № 18(6B).- P. 4705-4708.
 17. Davis J.M., Rowley S.D., Braine H.G. et al.. Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion // Blood.- 1990.- № 75(3).- P. 781-786.
 18. Zenhausem R., Tobler A., Leoncini L. et al.. Fatal cardiac arrhythmia after infusion of dimethyl sulfoxide-cryopreserved hematopoietic stem cells in a patient with severe primary cardiac amyloidosis and end-stage renal failure // Ann Hematol.- 2000.- № 79(9).- P. 523-526.
 19. Benekli M., Anderson B., Wentling D. et al.. Severe respiratory depression after dimethyl sulphoxide-containing autologous

- stem cell infusion in a patient with AL amyloidosis // *Bone Marrow Transplant.*— 2000.— № 25(12).— P.1299–1301.
20. Miniero R., Vai S., Giacchino M. et al. Severe respiratory depression after autologous bone marrow infusion // *Haematologica.*— 1992.— № 77(1).— P. 98–99.
21. Corso S., Vukelja S.J., Wiener D. et al. Diffuse alveolar hemorrhage following autologous bone marrow infusion // *Bone Marrow Transplant.*— 1993.— № 12(3).— P. 301–303.
22. Higman M.A., Port J.D., Beauchamp Jr N.J. et al. Reversible leukoencephalopathy associated with re-infusion of DMSO preserved stem cells // *Bone Marrow Transplant.*— 2000.— № 26(7).— P. 797–800.
23. Ferrucci P.F., Martinoni A., Cocorocchio E. et al. Evaluation of acute toxicities associated with autologous peripheral blood progenitor cell reinfusion in patients undergoing high-dose chemotherapy // *Bone Marrow Transplant.*— 2000.— № 25(2).— P.173–177.
24. Hequet O., Dumontet C., El Jaafari-Corbin A. et al. Epileptic seizures after autologous peripheral blood progenitor infusion in a patient treated with high-dose chemotherapy for myeloma // *Bone Marrow Transplant.*— 2002.— № 29(6).— P. 544.
25. Windrum P., Morris T.C.. Severe neurotoxicity because of dimethyl sulphoxide following peripheral blood stem cell transplantation // *Bone Marrow Transplant.*— 2003.— № 31(4).— P. 315.
26. Hoyt R., Szer J., Grigg A.. Neurological events associated with the infusion of cryopreserved bone marrow and/or peripheral blood progenitor cells // *Bone Marrow Transplant.*— 2000.— № 25(12).— P.1285–1287.
27. Gomez S., Nagler A., Naparstek E., Slavin S.. Transient elevation of serum lactic dehydrogenase following autologous bone marrow transplantation // *Bone Marrow Transplant.*— 1991.— № 7(6).— P. 487–488.
28. Burger J., Gilmore M.J., Jackson B. et al. Acute haemoglobinaemia associated with the reinfusion of bone marrow buffy coat for autologous bone marrow transplantation // *Bone Marrow Transplant.*— 1991.— № 7(4).— P. 322–324.
29. Galmes A., Besalduch J., Bargay J. et al. Long-term storage at -80 degrees C of hematopoietic progenitor cells with 5-percent dimethyl sulfoxide as the sole cryoprotectant // *Transfusion.*— 1999.— № 39(1).— P. 70–73.
30. Bakken A.M., Bruserud O., Abrahamsen J.F.. No differences in colony formation of peripheral blood stem cells frozen with 5 or 10% dimethyl sulfoxide // *J Hematother Stem Cell Res.*— 2003.— № 12(3).— P. 351–358.
31. Halle P., Tournilhac O., Knopinska-Posluszny W. et al.. Uncontrolled-rate freezing and storage at -80 degrees C, with only 3.5-percent DMSO in cryoprotective solution for 109 autologous peripheral blood progenitor cell transplantations // *Transfusion.*— 2001.— № 41(5).— P. 579–580.
32. Syme R., Bewick M., Stewart D. et al. The role of depletion of dimethyl sulfoxide before autografting: on hematologic recovery, side effects, and toxicity // *Biol Blood Marrow Transplant.*— 2004.— № 10(2).— P.135–141.
33. Martino M., Morabito F., Messina G. et al.. Fractionated infusions of cryopreserved stem cells may prevent DMSO-induced major cardiac complications in graft recipients // *Haematologica.*— 1996.— № 81(1).— P. 59–61.
34. Windrum P. et al.. Variation in dimethyl sulfoxide use in stem cell transplantation: a survey of EBMT centres // *Bone Marrow Transplantation.*— 2005.— № 36(7).— P. 601–603
35. Meyer T.P. et al.. Analysis and cryopreservation of hematopoietic stem and progenitor cells from umbilical cord blood // *Cytotherapy.*— 2006.— 8(3).— P. 265–276.
36. Laroche V. et al.. Cell loss and recovery in umbilical cord blood processing: a comparison of postthaw and postwash samples // *Transfusion.*— 2005.— № 45(12).— P. 1909–1916.
37. Syme R. et al. The Role of Depletion of Dimethyl Sulfoxide before Autografting: On Hematologic Recovery, Side Effects, and Toxicity // *Biology of Blood and Marrow Transplantation.*— 2004.— № 10(2).— P.135–141.
38. Yang H., Zhao H., Acker J. P., Liu J.Z., Akabutu J., McGann L.E.. Effect of dimethyl sulfoxide on post-thaw viability assessment of CD45+ and CD34+ cells of umbilical cord blood and mobilized peripheral blood // *Cryobiology.*— 2005.— № 51(2).— P. 165–175.
39. Nagamura-Inoue T. et al.. Wash-out of DMSO does not improve the speed of engraftment of cord blood transplantation: follow-up of 46 adult patients with units shipped from a single cord blood bank // *Transfusion.*— 2003.— № 43(9).— P.1285–1295.
40. Hahn T. et al.. Use of nonvolume-reduced (unmanipulated after thawing) umbilical cord blood stem cells for allogeneic transplantation results in safe engraftment // *Bone Marrow Transplantation.*— 2003.— № 32(2).— P. 145–150.
41. Rodriguez L. et al.. Washing of cord blood grafts after thawing: high cell recovery using an automated and closed system // *Vox Sang.*— 2004.— № 87(3).— P.165–172.
42. Spurr E.E. et al.. Cryopreserved human haematopoietic stem cells retain engraftment potential after extended (5–14 years) cryostorage // *Cryobiology.*— 2002.— № 44(3).— P. 210–217
43. Mugishima H. et al.. Effects of long-term cryopreservation on hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood // *Bone Marrow Transplantation.*— 1999.— № 23(4).— P. 395–396.
44. Broxmeyer H.E.. High-efficiency recovery of functional hematopoietic progenitor and stem cells from human cord blood cryopreserved for 15 years // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*— 2003.— № 100(2).— P. 645–650.
45. Broxmeyer H.E.. Experimental basis of cord blood transplantation // *Bone Marrow Transplantation.*— 2009.— № 44(10).— P. 627–633.
46. Scaradavou A. et al.. "Age" of the Cord Blood (CB) Unit: Impact of Long-Term Cryopreservation and Storage on Transplant Outcome // *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts).*— 2007.— № 110(11).— Abstract 2033.
47. Chow R. et al. The Effect of Storage Time on Clinical Outcomes of Plasma Depleted (PD) Cord Blood (CB) Transplantation // *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts).*— 2008.— № 112(11).— Abstract 4128.
48. Theunissen K. et al. Fully automated and reproducible cord blood processing using the Biosafe Sepax and Coolmix Devices // *ASN.*— San-Diego 2003.—
49. Lapierre, V. et al. Cord blood volume reduction using an automated system (Sepax) vs. a semi-automated system (Optipress II) and a manual method (hydroxyethyl starch sedimentation) for routine cord blood banking: a comparative study // *Cytotherapy.*— 2007.— № 9(2).— P. 165–169
50. Rodrigues L. et al. Washing of cord blood grafts after thawing: high cell recovery using an automated and closed system // *Vox Sanguinis.*— 2004.— № 87(3).— P.165–172.